

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 4 月 12 日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/25459 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/82, A01H 5/00 438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Sizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP99/05386
- (22) 国際出願日: 1999 年 9 月 30 日 (30.09.1999)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 倉屋芳樹 (KURAYA, Yoshiki) [JP/JP]. 小鞠敏彦 (KOMARI, Toshihiko) [JP/JP]. 樋江井祐弘 (HIEI, Yukoh) [JP/JP]; 〒
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: VECTORS FOR TRANSFORMING PLANTS

(54) 発明の名称: 植物の形質転換用ベクター

(57) Abstract: Vectors for transforming plants with the use of agrobacteria which have been modified so as to elevate the possibility of the recognition of the border sequences of the vectors by vir proteins of the agrobacteria, thereby lowering the possibility of the transfer of DNAs other than T-DNA into plant chromosomes. More particularly, the above-vectors are those to be used in transforming plants which have right and left border sequences which can be recognized by the vir proteins of the agrobacteria, a T-DNA sequence which is located between these border sequences and into which a gene to be transferred into plants can be inserted, and a replication origin enabling the replication of the vectors in bacteria, characterized by having a plural number of left border sequences.

(57) 要約:

本発明は、アグロバクテリウムを利用した植物の形質転換のためのベクターを改変し、アグロバクテリウムのvirタンパク質群がベクターのボーダー配列を認識する確率を高め、T-DNA以外のDNAが植物の染色体に移される確率を低くする。

本発明は、詳細には、アグロバクテリウムのvirタンパク質群によって認識されうる右ボーダー配列及び左ボーダー配列、それらのボーダー配列間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能なT-DNA配列、並びに細菌での前記ベクターの複製を可能にする複製開始点を有する植物の形質転換用ベクターであって、左ボーダー配列が複数個配置されたことを特徴とするベクターを提供する。

WO 01/25459 A1

明 細 書

植物の形質転換用ベクター

5 技術分野

本発明は、植物の形質転換用ベクターに関する。より具体的には、アグロバクテリウムを利用した植物の形質転換方法において有用なベクターに関する。本発明はさらに、本発明のベクターを使用する植物の形質転換方法に関する。本発明は特に、食品として摂取されることのある遺伝子組換え植物を作出するのに有用である。

背景技術

15 土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根頭癌腫病 (Crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与していること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAには癌腫の誘発に必要なホルモン(サイトカイニンとオーキシン)の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のヴィルレンス領域(Vir領域)に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。このT-DNAの両端に存在するボーダー配列をそれぞれ右ボーダー配列、左ボーダー配列という。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium* *rizogenesis* も Ri プラスミドによる同様なシステムを有している。

25 より具体的には、vir領域に存在する遺伝子群を基に造られるタンパク質群(virタンパク質群)が左右のボーダー配列を認識し、その間のT-DNAを植物ゲノムに組み込む。この性質をもとに、T-DNA中に外来遺伝子を挿入することで植物の形質転換ができるようになり、アグロバクテリウムによる植物の形質転換が発展してきた。

しかし、近年、ある種の植物を形質転換する場合に、ボーダー配列で T-DNA が切り出されずに、T-DNA が左ボーダー配列の外側の部分も含めて植物の染色体に移される場合があることが分かってきた (Ramanathan et al. Plant Molecular Biology 28, 1149-1154 (1995)、Kononov et al. Plant Journal 11, 945-957

5 (1997)など)。T-DNA 部分以外の不要な DNA が植物の染色体に移ることにより、形質転換により作成された遺伝子組換え植物が予想していない形質をもつことが懸念され、遺伝子組換え植物を利用した食品の消費者の認識 (パブリックアクセプタンス) にも重要な影響を与えることが考えられる。このためアグロバクテリウム内の T-DNA 部分以外の不要な DNA が植物の染色体に移らないようにする方法
10 が要求されている。

T-DNA 以外の DNA 部分が植物の染色体に移るのは、アグロバクテリウムの vir タンパク質群がボーダー配列を認識していないためと考えられる。しかしながら、このような場合に対処し、ボーダー配列以外の DNA 断片が移らない、あるいは移りにくいように工夫されたベクターは開発されていない。

15 発明者は、T-DNA の外側の DNA が T-DNA と一緒に植物の染色体に移るのは、アグロバクテリウムの vir タンパク質群がボーダー配列を認識していないためと考えた。そこで、アグロバクテリウムを利用した植物の形質転換において用いるベクターを改変し、アグロバクテリウムの vir タンパク質群がベクターのボーダー配列を認識する確率を高め、目的とする DNA 以外の DNA が植物の染色体に移され
20 る確率を低くすることを課題とし、鋭意検討した。その結果、2つのボーダー配列のうち、形質転換用ベクターにおいて左ボーダー配列を複数並べることで、T-DNA の外側の DNA が植物の染色体に挿入されにくくなることを見出し、本発明を完成するに至った。

25 発明の概要

本発明は、アグロバクテリウムの機能を利用した植物の形質転換に用いるベクターであって、目的とする形質転換のためには不要な DNA、すなわち T-DNA 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように改良された左ボーダー配列を有することを特徴とする植物の形質転換用ベクターを提供する。より詳細には、vir タ

ンパク質群によって認識されうる右ボーダー配列及び左ボーダー配列、それらのボーダー配列間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能な T-DNA 配列、並びに細菌（アグロバクテリウム及びベクター生産用細菌等）でベクターの複製を可能にする複製開始点（ori）を有するベクターであって、T-DNA 5 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように改良された左ボーダー配列を有することを特徴とする植物の形質転換用ベクターを提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例で用いた pSLB0 ベクターを表す。pSB11 の T-DNA 内部にユビキチンプロモーターとユビキチンイントロンによりハイグロマイシン耐性遺伝子（HPT）を発現させるカセットを持ち、さらに制限酵素 StuI で認識される部位に、ユビキチンプロモーターによりカタラーゼイントロンを含む GUS 遺伝子を発現させるカセットを挿入したものである。

図 2 は、pSLB0 ベクター、pSLB2 ベクター、pSLB3 ベクターの、各々の左ボーダー配列（以下「LB」ということもある。）付近の地図を表す。pSLB0 の LB と GUS 発現カセットの間の制限酵素 PvuII で認識される部位に、左ボーダー配列を 2 つ又は 3 つ持つ DNA 断片を挿入したものである。合成 DNA 断片により新たに挿入された左ボーダー配列（以下「sLB」と表す）が 2 つ、すなわち LB が合計 3 つのものが pSLB2、合成 DNA 断片により新たに挿入された sLB が 3 つ、すなわち LB の合計が 4 つのものが pSLB3 である。

発明を実施するための好ましい形態

（1）ベクターの作製

本発明のベクターは、目的とする形質転換のためには不要な DNA、すなわち T-DNA 25 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように機能する左ボーダー配列を有する。vir タンパク質群によって認識され得る塩基配列（例えば、公知の左ボーダー配列）が複数個配置された配列を含むよう、左ボーダー配列が改良されたベクターは、本発明の好ましい一態様である。

左ボーダー配列が複数個配置された DNA 断片は、公知のボーダー配列を基に

種々の公知の方法を用いて作成することができる。例えば、既存の Ti プラスミド中に既に存在する左ボーダー配列と同一の配列の一本鎖 DNA を合成し、そしてこれを二本鎖とし、必要であれば複数個連結することにより作成することができる。このように作成した DNA 断片を、植物形質転換用ベクターの T-DNA の下流の
5 既存の左ボーダー配列の前及び／又は後ろの付近に、適当な制限酵素部位等を利用して挿入することにより本発明のベクターを容易に作成することができる。

左ボーダー配列を改良して本発明のベクターとすることができる植物転換用ベクターは、少なくとも、vir タンパク質群によって認識されうる左右ボーダー配列、その間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能な T-DNA
10 配列、並びにベクター生産用細菌（例えば、大腸菌）で機能可能な複製開始点を有することが必要である。好ましくは、アグロバクテリウムで機能することができる複製開始点を有するものがよい。

このような条件を満たすベクターであれば、左ボーダー配列の改良は、種々のベクターのいずれにも適用することができる。例えば、アグロバクテリウムを利用する植物の形質転換方法には（１）左右ボーダー配列を持ち、T-DNA 中に外来
15 遺伝子を挿入したサイズの小さな中間クローニングベクター、及び vir 領域を有するアクセプターTi プラスミドから、相同組換えによりハイブリッド Ti プラスミドベクターを形成し、これを含むアグロバクテリウムを植物に感染させる方法；（２）vir 領域を有さないサイズの小さな Ti プラスミド（ミニプラスミド又は
20 はマイクロ Ti プラスミドと呼ばれ、多くの細菌内で複製可能である。）の T-DNA 中に外来遺伝子を挿入し、これを、vir 領域を有するが T-DNA を欠失させたプラスミドをあらかじめ導入したアグロバクテリウムへさらに導入し、これらを含むアグロバクテリウムを植物に感染させる方法；又は（３）左右のボーダー配列を持ち、T-DNA 中に外来遺伝子を挿入したサイズの小さなクローニングベクター、及び
25 vir 領域の一部（vir 領域の全長から一部を欠失させたもの）を有するアクセプターTi プラスミドから、相同組換えによりハイブリッド Ti プラスミドベクターを形成し、これを vir 領域（全長）を有するが T-DNA を欠失させたプラスミドをあらかじめ導入したアグロバクテリウムへさらに導入し、これらを含むアグロバクテリウムを植物に感染させる方法等があるが、これらの方法における種々の

ベクターの左ボーダー配列の改良が可能である。サイズの小さな Ti プラスミドの左ボーダー配列を改良したものは、T-DNA 中の外来遺伝子の改良操作等において取り扱いが容易であり、本発明のベクターの好ましい一態様である。このようなサイズの小さな Ti プラスミドの例としては、pBI101、pBI121（いずれも

5 CLONTECH 社）、又は後述する実施例中で用いた pSB11 がある。

また、本発明は、Ti プラスミドのみならず、Ri プラスミドにおいても適用することができる。

本発明のベクターは、形質転換体を選択可能とするマーカー遺伝子、例えば抗生物質耐性遺伝子、発色性遺伝子等を T-DNA 配列中に含んでもよい。具体的には、通常使用されるものを常法により用いることができ、テトラサイクリン、アンピシリン、又はカナマイシン若しくはネオマイシン、ハイグロマイシン又はスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等の他、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン（GFP）、 β -ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）等が例示される。また、これとは別に、T-DNA 配列の外側、好ましくは左ボーダー配列の下流にマーカー遺伝子を含んでもよい。このような位置に配置されたマーカー遺伝子は改良されたボーダー配列の効果を検討するために有用である。

ここで、複製開始点とは、複製開始反応が起こる特定の DNA 領域をいい、一般には Ori と呼ばれる領域をいう。

20 （２）形質転換

本発明のベクターは、その T-DNA 中に目的とする形質転換を行うための外来遺伝子を挿入して使用する。挿入する外来遺伝子は、通常、宿主植物体で機能可能なプロモーターとその下流の構造遺伝子（植物へ付与しようとする形質をコードする）を含む。必要に応じ、遺伝子（群）を複数個連結し、及び／又はプロモーターとその下流の構造遺伝子との間に発現効率を高めるための配列を介在させ、T-DNA 間へ挿入してもよい。

外来遺伝子を含む本発明のベクターは、目的とする植物に導入するためにその植物への感染能力を有するアグロバクテリウム属に属する細菌（例えば *Agrobacterium tumefaciens*）内へ導入される。この操作には、当業者に周知の

種々の方法を利用することができる。接合操作等を利用してアグロバクテリウム内に移してもよいし、可能であれば、外来遺伝子を含む本発明のベクターで直接アグロバクテリウムを形質転換してもよい。

5 本発明のベクターを含んだアグロバクテリウムを植物に感染させるには、従来
の技術を利用することができる。例えば、植物体の一部を傷つけ、そこに細菌を
感染させる方法、カルスに感染させる方法、プロトプラストと細菌を共培養する
方法、又は葉組織の小片を細菌とともに培養する方法がある。これらの方法から
得られた形質転換細胞は、適当なマーカーを指標とするか、又は所望の形質を発
現しているか否かによって他の細胞から選択することができる。形質転換細胞は
10 さらに、従来技術を利用して分化させることで組換え植物体とすることができる。

植物の染色体 DNA に外来遺伝子を含む T-DNA が組み込まれる際には、*vir* 領域
が必要である。*vir* 領域は、外来遺伝子を有するベクターから供給され得るし、
また、外来遺伝子を有するベクターとは異なるベクターから供給され得る。

15 本発明のベクターを用いて形質転換された植物細胞は、従来技術を利用して分
化させることで、組換え植物体とすることができる。形質転換植物は、適当なマ
ーカーを指標とするか、又は所望の形質を発現しているか否かによって他のもの
から選択することができる。

20 目的とする形質転換のためには不要な DNA が植物染色体へ挿入されたか否かの
解析は、当業者に周知の種々の方法を用いて行うことができる。例えば、ボーダ
ー配列の外側のベクター DNA 配列を基にオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、
これを用いた PCR により形質転換植物の染色体 DNA を解析することができる。ま
た、T-DNA 配列の外側にマーカー遺伝子を含むベクターを用いて形質転換した場
合は、その発現の有無により、解析することができる。

25 本発明は、目的とする形質転換のためには不要な DNA が挿入されにくいという
機能を有するが、「挿入されにくい」とは、左ボーダー配列が改良されていない
ベクターを用いた場合と比較して、不要な DNA が宿主植物染色体に挿入される割
合が少ないこと、挿入される長さが短いこと、若しくは挿入されないこと、及び
／又は、左ボーダー配列が改良されていないベクターを用いた場合と比較して、
意図しない形質転換が起こる割合が少ないこと、起こったとしても軽微であるこ

と、若しくは起こらないことをいう。また、「目的とする形質転換のためには不要な DNA」とは、ベクター中の T-DNA 配列の外側に位置する DNA（すなわち T-DNA 以外の DNA）部分又は断片をいう。それ自体で機能可能であるか又はポリペプチド又はタンパク質をコードしているかは問わない。

- 5 本発明の形質転換方法により形質転換される植物は、トウモロコシ、モロコシ、ライ小麦、大麦、オート麦、ライ麦、小麦、タマネギ、若しくはイネ等の単子葉植物又は大豆、アルファルファ、タバコ、アブラナ、ヒマワリ、ジャガイモ、コショウ、若しくはトマト等の双子葉植物のいずれでもよい。本発明の方法によれば目的とする形質転換のためには不必要な DNA が植物染色体へ挿入されにくく、
- 10 また形質転換により作成された遺伝子組換え植物は予想していない形質をもつことが少ないことから、本発明の方法は、アグロバクテリウムによる形質転換では T-DNA 部分以外の不要な DNA が植物の染色体に移ることが特に懸念される、他の生物に食品として摂取されうる植物の形質転換に適している。特に、単子葉植物、とりわけイネの形質転換に適している。
- 15 なお、本明細書で「植物」というときは、特に明示しない限り、植物体（個体）の他、その種子（発芽種子、未熟種子を含む。）、部分（葉、根、茎、花、雄蕊、雌蕊、それらの片を含む。）、植物培養細胞、カルス、プロトプラストを含む。

実施例

20 実施例 1

（1）ベクターの作製

- プラスミドベクター pSB11 (Genbank Accession No. AB027256, Komari et al. Plant Journal 10, 165-174 (1996)) の T-DNA 内部にユビキチンプロモーターとユビキチンイントロン (Christensen et al, Plant Molecular Biology 18, 675-25 689 (1992)) によりハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) を発現させるカセットを持つプラスミドを作成し、さらに制限酵素 *Stu*I で認識される部位に、ユビキチンプロモーターによりカタラーゼイントロンを含む GUS 遺伝子 (Ohta et al. Plant Cell Physiology 31, 805-813 (1990)) を発現させるカセットを挿入したプラスミドを作成した (pSLB0、図 1、配列番号 1)。PSLB0 の塩基配列を配列番

号 1 に示す。

次に Ti プラスミド pTiAch5 の塩基配列 (Genbank Accession No. K00548) を基に左ボーダー配列 (以下「LB」と略す。) を含む合成 DNA と、この合成 DNA に相補的な合成 DNA を作成し、2 つをアニーリング、平滑化させて、LB 配列を 2 つあるいは 3 つ持つ DNA 断片を作成した。合成した 2 つの合成 DNA の塩基配列を配列番号 2 及び 3 に示す。この DNA 断片を pSLB0 の LB と GUS 発現カセットの間の制限酵素 PvuII で認識される部位に挿入し、LB を複数付加させたベクターを作成した。合成 DNA による LB (以下「sLB」ということもある。) が 2 つ、すなわち LB が合計 3 つのものを pSLB2、sLB が 3 つ、すなわち LB の合計が 4 つのものを pSLB3 とした (pSLB0、pSLB2、pSLB3 の合成 LB 付近の地図を図 2 に示す)。これら 3 種のプラスミドをそれぞれ、プラスミドベクター pSB1 (Genbank Accession No. AB027255、Komari et al. Plant Journal 10, 165-174 (1996)) を導入した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 に導入し、以下の試験に供試した。

(2) 形質転換

LBA4404 (pSLB0)、LBA4404 (pSLB2)、LBA4404 (pSLB3) を用い、イネ品種「朝の光」の未熟胚由来のカルスをそれぞれ形質転換した。形質転換は樋江井らの方法 (Hiei et al. Plant Journal 6, 271-282 (1994)) に従った。

(3) 形質転換体での GUS 遺伝子発現の解析

実施例 2 で得られたハイグロマイシン抵抗性植物の葉の一部を X-Gluc により染色し、GUS 遺伝子の発現を調べた。LBA4404 (pSLB0) で形質転換した植物では 340 個体のうち 17 個体が GUS 遺伝子の発現を示した。このことは LB が一つである従来のベクターで形質転換された植物の 5% ではボーダー配列外のアグロバクテリウム由来の DNA が植物に導入されたことを示す。これに対し、LBA4404 (pSLB2)、LAB4404 (pSLB3) を形質転換した植物では合成 LB の数が増えるに従い GUS 遺伝子の発現を示す個体は減少した (表 1)。これは合成 LB をベクターに入れることにより左ボーダー配列外の DNA が植物に移りにくくなったことを示す。

(4) GUS 遺伝子発現を示さなかった個体のゲノミック DNA の解析

上記試験で GUS 遺伝子の発現を示さなかった個体の中には左ボーダー配列外の

DNA が植物染色体に導入されているが GUS 遺伝子を発現させるユビキチンプロモーターまでは至らないものが含まれていることが考えられる。そこで、GUS 遺伝子の発現を示さなかった植物からランダムに、それぞれ 60 前後の独立の形質転換体を選んでゲノミック DNA を抽出し、PCR 解析を行った。PCR 解析に用いたプライマーは本来の LB と合成 LB の間から GUS 遺伝子の一部までを増幅できるように作成した。プライマーの配列を配列番号 4 及び 5 に示す。

PCR 解析の結果、LBA4404 (pSLB0) で形質転換した植物では 67 個体中 7 個体 (10.4%) で DNA の増幅が確認され、LB が一つである従来のベクターでは作出された形質転換体の 1 割以上の高頻度で目的とする T-DNA 以外のアグロバクテリウム由来 DNA が染色体に組み込まれていることが明らかとなった。これに対し、合成 LB をもつ LBA4404 (pSLB2) 及び LBA4404 (pSLB3) で形質転換した植物では、そのような DNA の増幅が確認された個体はなかった。

これらの結果を表 1 及び表 2 に示した。

表 1. GUS 遺伝子発現の解析

ベクター	形質転換個体数	GUS 発現個体の割合 (%)
pSLB0	340	5.0
pSLB2	327	1.2
pSLB3	370	0.8

表 2. ゲノミック DNA の解析

ベクター	DNA 抽出個体数	PCR により DNA が増幅された個体数
pSLB0	67	7
pSLB2	55	0
pSLB3	58	0

以上の結果から、本発明により、ボーダー配列外の DNA が植物染色体に組み込まれることが少なくなり、目的とする T-DNA だけを導入できる効率を向上させることが可能となった。

本明細書では、主として、複数の左ボーダー配列を使用する例によって本発明を説明した。この場合の複数の左ボーダー配列は、それぞれ同一のアグロバクテ

- リウム由来のものであってもよいし、それぞれ異なるアグロバクテリウム由来のものであってもよい。しかし、本発明の主眼は、植物形質転換用ベクターの左ボーダー配列を、vir タンパク質群によってより確実に認識されるように改良し、それによって T-DNA 以外の不要な DNA が植物染色体に移らないようにできること
- 5 である。したがって、そのように機能することのできる改良された左ボーダー配列を有するベクターであれば、本発明の範囲に含まれる。改良された左ボーダー配列は、上に説明したもの他、例えば、(1) プラスミド中に既に存在する左ボーダー配列において、一又は複数の塩基を欠失、置換若しくは付加することにより、vir タンパク質群がより確実に認識しうる塩基配列としたもの；(2) プ
- 10 ラスミド中に既に存在する左ボーダー配列付近の配列において、一又は複数の塩基を欠失、置換、挿入若しくは付加することにより、vir タンパク質群がより確実に左ボーダー配列を認識しうるようにしたもの；(3) vir タンパク質群によって認識され得る塩基配列を複数個含むような配列としたもの；及び(4) これらの任意の組み合わせを含み得る。

請 求 の 範 囲

1. アグロバクテリウムの機能を利用した植物の形質転換に用いるベクターであって、T-DNA 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように左ボーダー配列
5 が改良されたことを特徴とする植物の形質転換用ベクター。
2. アグロバクテリウムの *vir* タンパク質群によって認識されうる右ボーダー配列及び左ボーダー配列、それらのボーダー配列間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能な T-DNA 配列、並びに細菌での前記ベクターの複製を可能にする複製開始点を有する植物の形質転換用ベクターであって、T-DNA
10 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように左ボーダー配列が改良されたことを特徴とする前記ベクター。
3. 左ボーダー配列の改良が、左ボーダー配列が複数個配置されたことを含む、請求項 1 又は 2 に記載のベクター。
4. T-DNA 配列中に、形質転換体を選択可能とするマーカー遺伝子を含む請求
15 項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のベクター。
5. 複製開始点が、ベクター生産用細菌及びアグロバクテリウムを含む細菌でのベクターの複製を可能にするものである、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のベクター。
6. 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のベクターを有するアグロバクテリウ
20 ムを用いる植物の形質転換方法。
7. 請求項 6 に記載の方法により形質転換された植物。

1

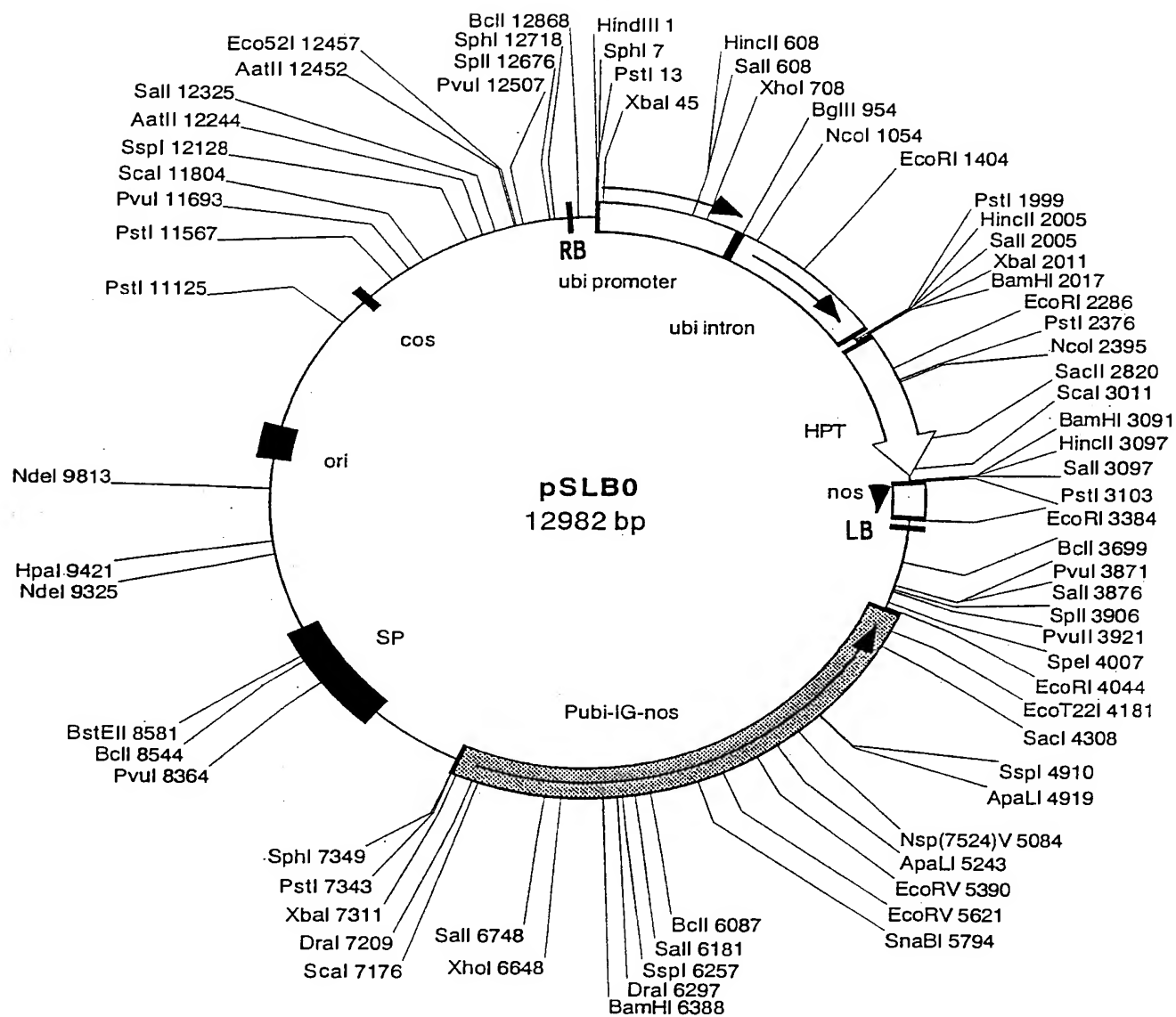
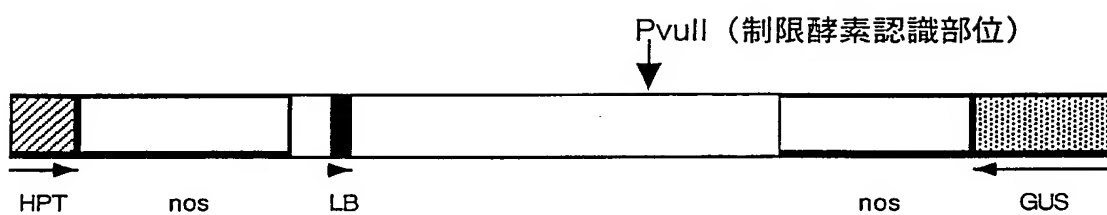
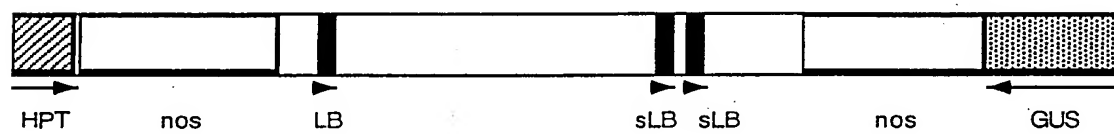


図 2

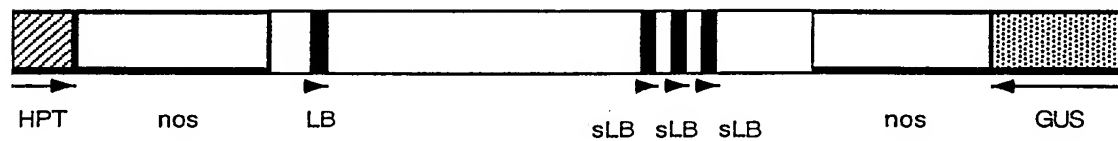
pSLB0



pSLB2



pSLB3



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> 植物の形質転換用ベクター

<130> YCT-441

<160> 5

<210> 1

<211> 12982

<212> DNA

<400> 1

```

aagcttgcat gcctgcagtg cagcgtgacc cggtcgtgcc cctctctaga gataatgagc    60
attgcatgtc taagttataa aaaattacca catatTTTTT ttgtcacact tgtttgaagt   120
gcagttttatc tatctttata catatatTTA aacittactc tacgaataat ataatctata   180
gtactacaat aatatcagtg ttttagagaa tcatataaat gaacagttag acatgggtcta   240
aaggacaatt gagtatTTTg acaacaggac tctacagttt tatctTTTta gtgtgcatgt   300
gttctccTTT tTTTttgcaa atagcttcac ctatataata cticatccat tttattagta   360
catccatTTA gggTTtaggg ttaatggTTT ttatagacta atTTTTttag tacatctatt   420
ttattctatt ttagcctcta aattaagaaa actaaaactc tatTTtagtt tTTtatTTA   480
ataatttaga tataaaatag aataaaataa agtgactaaa aattaacaa ataccctTTA   540
agaaattaaa aaaactaagg aaacatTTTT ctgttttTga gtagataatg ccagccgttt   600
aaacgccgtc gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcggggcc   660
aagcgaagca gacggcacgg catctctgtc gctgccctctg gacccctctc gagagtTccg   720
ctccaccgtt ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaat tgcgtggcgg agcggcagac   780
gtgagccggc acggcaggcg gccctctcct cctctcacgg cacggcagct acgggggatt   840
cctttcccac cgctccttcg ctttcccttc ctgcgccgcc gtaataaata gacacccctt   900
ccacaccctc tttccccaac ctctgtttgt tcggagcgca cacacacaca accagatctc   960

```

ccccaaatcc acccgtcggc acciccgcct caaggtacgc cgctcgtcct cccccccccc 1020
 cctctcttac cttctctaga tcggcgctcc ggtccatggt tagggcccgg tagttctact 1080
 tctgttcattg ttgtgttag atccgigttt gtgttagatc cgtgcgtcta gcgttcgtac 1140
 acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgatgtctaa ctigccagtg tttctctttg 1200
 gggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcattg attttttttg 1260
 tttcgttgca tagggtttggt ttgccccttt tccctttatt caataatgc cgtgcacttg 1320
 ttgttcgggt catcttttca tgcctttttt tgccttggtt gigtatggtt ggtctggttg 1380
 ggcggtcgtt ctatgcgga gtagaattct gtttcaaact acctggtgga tttattaatt 1440
 ttggatctgt atgtgtgtgc catacataatt catagttacg aatigaagat gatggatgga 1500
 aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca tatacagaga 1560
 tgccttttgt tcgcttggtt gigtatggtt ggtgtggttg ggcggtcgtt cattcgttct 1620
 agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat 1680
 gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat cgatctagga 1740
 taggtataca igtatgtgtg ggttttactg atgcataaac atgatggcat atgcagcatc 1800
 taticatatg ctctaaccct gactacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat 1860
 tattttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt 1920
 agccctgcct tcatacgcta ttattttgct tgggtactgt tcttttctcg atgctcacc 1980
 tgttgttttg tgttacttct gcaggtcgac tctagaggat ccgcgtccgg gggcaatgag 2040
 atatgaaaaa gccatgaact accgcgacgt ctgtcgagaa gtttctgac gaaaagttcg 2100
 acagcgtctc cgacctgatg cagctctcgg agggcgaaga atctcgtgct ttacagcttcg 2160
 atgtaggagg gcgtggatat gtcctgcggg taaatagctg cgccgatggt ttctacaaag 2220
 atcgttatgt ttatcggcac ttigcatcgg ccgcgtccc gattccggaa gtgcttgaca 2280
 ttggggaatt cagcgagagc ctgacctatt gcatctccc ccgtgcacag ggtgtcacgt 2340
 tgcaagacct gccatgaaacc gaactgccc ctgttctgca gccggtcgag gaggccatgg 2400
 atgcgatcgc tgcggccgat cttagccaga cgagcgggtt cggcccatc ggaccgcaag 2460
 gaatcggta atacactaca tggcgtgatt tcatatgcgc gatgtctgat ccccatgtgt 2520
 atcactggca aactgtgatg gacgacaccg tcagtgcgtc cgtcgcgag gctctcgatg 2580
 agctgatgct ttgggcccag gactgcccc aagtcgggca cctcgtgcac gcggatttcg 2640
 gctccaacaa tgtcctgacg gacaatggcc gcataacagc ggcatgtgac tggagcgagg 2700

cgatgttcgg ggattcccaa tacgaggtcg ccaacatctt ctcttgagg ccgtgggttg 2760
 ctigtatgga gcagcagacg cgctacttcg agcggaggca tccggagctt gcaggatcgc 2820
 cgcggctccg ggcgtataatg ctccgcattg gtcttgacca actctatcag agcttggttg 2880
 acggcaattt cgatgatgca gcttgggctg agggtcgatg cgacgcaatc gtccgatccg 2940
 gagccgggac tgcgggcggt acacaaatcg cccgcagaag cgcggccgtc tggaccgatg 3000
 gcigtgtaga agtactcgcc gatagtggaa accgacgcc cagcactcgt ccgagggcaa 3060
 aggaatagag tagatgccga ccgaacaacg gatccgtcga cctgcagaga tcgttcaaac 3120
 atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcatg gattatcata 3180
 taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt 3240
 atgagatggg tttttatgat tagagtcctg caattataca ttttaatacgc gatagaaaac 3300
 aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgcattctat gttactagat 3360
 cgatgataag cigtcaaaca tgagaattca gtacattaaa aacgtccgca atgtgttatt 3420
 aagttgtcta agcgtcaatt tgtttacacc acaatataatc ctgccaccag ccagccaaca 3480
 gtcctccgac cggcagctcg gcacaaaatc accactcgat acaggcagcc catcagtcgg 3540
 ggacggcgtc agcgggagag ccgttgtaag gcggcagact ttgctcatgt taccgatgct 3600
 attcggaaga acggcaacta agctgccggg ttigaaacac ggatgatctc gcggagggtg 3660
 gcatgttgat tgtaacgatg acagagcggt gctgccctgt atcaaataatc atctccctcg 3720
 cagagatccg aattatcagc ctctttattc atttctcgct taaccgtgac aggctgtcga 3780
 tcttgagaac tatgccgaca taataggaaa tcgctggata aagccgctga ggaagctgag 3840
 tggcgctatt tctttagaag tgaacgttga cgatcgtcga ccgtaccccg atgaattaat 3900
 tcggacgtac gtcttgaaca cagctggata ctacttggg cgattgicat acatgacatc 3960
 aacaatgtac ccgttttgtt aaccgtctct tggaggttcg tatgacacta gtggttcccc 4020
 tcagcttgcg actagatgtt gaggaattcg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga 4080
 taatttatcc tagtttgcgc gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg 4140
 cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgttaattat 4200
 tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg 4260
 attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tcaattcgag ctcggtacgc 4320
 aattccccac cgaggctgta gccgacgatg gtgcgccagg agagttgttg attcattgtt 4380
 tgccctccctg ctgcgggtttt tcaccgaagt tcatgccagt ccagcgtttt tgcagcagaa 4440

aagccgccga cttcggtttg cggtcgag tgaagatccc tttcttgtaa ccgccaacgc 4500
gcaataatgcc ttgcgaggtc gcaaaatcgg cgaaattcca tacctgttca ccgacgacgg 4560
cgctgacgcg atcaaagacg cggtgataca tatccagcca tgcacactga tactcttcac 4620
tccacatgtc ggtgtacatt gagtgcagcc cggctaacgt atccacgccg taticggiga 4680
tgataatcgg ctgatgcagt ttctcttgcc aggccagaag ttctttttcc agtaccttct 4740
ctgccgtttc caaatcgccg ctttggacat accatccgta ataacgggtc aggcacagca 4800
catcaaagag atcgctgatg gtatcgggtg gagcgctgca gaacattaca ttgacgcagg 4860
tgatcggacg cgtcgggtcg agtttacgcg ttgcttccgc cagtggcgaa atattcccgt 4920
gcacttgcgg acgggtatcc ggttcgttgg caatactcca catcaccacg cttgggttgg 4980
ttttgtcacg cgctatcagc tctttaatcg cctgtaagtg cgcttgctga gtttccccgt 5040
tgactgccctc ttcgctgtac agttctttcg gcttgttgcc cgcttcgaaa ccaatgccta 5100
aagagagggt aaagccgaca gcagcagttt catcaatcac cacgatgcca tgttcatctg 5160
cccagtcgag catctcttca gcgtaagggt aatgcgaggt acggtaggag ttggcccca 5220
tccagtccat taatgcgtgg tcgtgcacca tcagcacgtt atcgaatcct ttgccacgta 5280
agtcgcctc ttcatgacga ccaaagccag taaagtagaa cggtttgttg ttaatcagga 5340
actgttcgcc cttcactgcc actgaccgga tgccgacgcg aagcgggtag atatcacact 5400
ctgtctggct tttggctgtg acgcacagtt catagagata accttcccc gggtgccaga 5460
gggtcggatt caccacttgc aaagtcctgc tagtgccttg tccagtigca accacctgtt 5520
gatccgcctc acgcagttca acgtgacat caccattggc caccacctgc cagicaacag 5580
acgcgtgggt acagtcttgc gcgacatgcg tcaccacggt gatatcgctc acccagggtg 5640
tcggcggtgt gtagagcatt acgtcgcgat ggattccggc atagttaaag aaatcatgga 5700
agtaagactg ctttttcttg ccgttttcgt cggtaatcac cattcccggc gggatagtct 5760
gccagttcag ttcgttgttc acacaaacgg tgatacgtac acttttcccc gcaataacat 5820
acggcgtgac atcggcttca aatggcgat agccgccctg atgtccctc acttcttgat 5880
tattgacca cactttgccg taatgagtga ccgcatcgaa acgcagcacg atacgttggc 5940
ctgcccaccc tttcgggtata aagacttcgc gctgatacca gacgttgccc gcataattac 6000
gaatatctgc atcggcgaac tgatcgttaa aactgccttg cacagcaatt gcccggttt 6060
cttgtaacgc gctttccac caacgtgat caattccaca gttttcgcga tccagactga 6120
atgcccacag gccgtcgagt tttttgattt cacgggttgg ggtttctaca ggacggacga 6180

gtcgacgggtt ctgtaactat catcatcatc atagacacac gaaataaagt aatcagattt 6240
 tcagttaaag ctatgtaata tttaacacat aaccaatcaa ttaaaaaata gatcagttta 6300
 aagaaagatc aaagctcaaa aaaataaaaa gagaaaaggg tcctaaccaa gaaaatgaag 6360
 gagaaaaact agaaatttac cctgtaggga tccatgttct aggatctggg tgtgtgtgtg 6420
 tgcgciccca acaacacgag gttggggaaa gaggggtgtg aggggggtgtc tatttattac 6480
 ggcgggagag gaagggaag cgaaggagcg gtgggaaagg aatccccctg agctgccgtg 6540
 ccgtgagagg aggaggagcg cgcctgccgt gccggctcac gtcgccgt cccccacgca 6600
 atttctggat gccgacagcg gagcaagtc aacgggtggag cggaactctc gagaggggtc 6660
 cagaggcagc gacagagatg ccgtgccgtc tgcctcgctt ggcccagcgc gacgctgctg 6720
 gtctcgctgg tgggtgccgt tagactcgctc gacggcgctt aacaggctgg cattatctac 6780
 tcgaaacaag aaaaatgttt ccttagtttt ttaatttct taaagggtat ttgtttaatt 6840
 tttagtcact ttattttatt ctattttata tctaaattat taaataaaaa aactaaaaata 6900
 gagttttagt ttctttaatt tagaggctaa aatagaataa aatagatgta ctaaaaaaat 6960
 tagtctataa aaaccattaa ccctaaaccc taaatggatg tactaataaa atggatgaag 7020
 tattatatag gtgaagctat ttgcaaaaaa aaaggagaac acatgcacac taaaaagata 7080
 aaactgtaga gtccgttgtt caaaatactc aattgtcctt tagaccatgt ctaactgttc 7140
 atttataiga ttctctaaaa cactgatatt attgtagtac tatagattat attattcgta 7200
 gagtaaagtt taaatataat tataaagata gataaacctg acttcaaaca agtctgacaa 7260
 aaaaaatatg tggtaatttt ttataaccta gacatgcaat gctcattatc tctagagagg 7320
 ggcacgaccg ggctacgctg cactgcagcg atgcaagctc ctaacatitt attagagagc 7380
 aggctagtgt cttagataca tgatcttcag gccgttatct gtcagggcaa gcgaaaattg 7440
 gccatttatg acgaccaatg ccccgagaa gctcccatct ttgccgcat agacgccgcg 7500
 cccccctttt ggggtgtaga acatcccttt gccagatgtg gaaaagaagt tcgttgtccc 7560
 attgttggca atgacgtagt agccggcgaa agtgcgagac ccatttgcgc tataatataag 7620
 cctacgattt ccgttgcgac tattgtcgta attggatgaa ctattatcgt agtctctctc 7680
 agagtgtcgt taatttgatg gactattgtc gtaattgctt atggagtgtt cgtagtgtct 7740
 tggagaaatg tcgtagtgtg atggggagta gtcataggga agacgagctt catccactaa 7800
 aacaatiggc aggtcagcaa gtgcctgccc cgatgccatc gcaagtacga ggcttagaac 7860
 caccticaac agatcgcgca tagtcttccc cagctctcta acgcttgagt taagccgctc 7920

cgcgaagcgg cgtcggcttg aacgaattgt tagacattat ttgccgacta ccttgggtgat 7980
 ctgccttttc acgtagttaa caaatcttct caactgatct gcgcgcgagg ccaagcgatc 8040
 ttcttgtcca agataagcct gcctagcttc aagtaigacg ggctgatact gggccggcag 8100
 gcgctccatt gcccagtcgg cagcgacatc cttcggcgcg attttgccgg ttactgcgct 8160
 gtaccaaattg cgggacaacg taagcactac atttcgctca tcgccagccc agtcggggcg 8220
 cgagtcccat agcgtaagg ttctatttag cgcttcaa atagatctgtt caggaaccgg 8280
 atcaaagagt tcctccgccg ctggacctac caaggcaacg ctatgtttct ttgcttttgt 8340
 cagcaagata gccagatcaa tgtcgatcgt ggctggctcg aagataacct caagaatgtc 8400
 attgcgctgc cattctccaa atigcagttc gcgcttagct ggataacgcc acggaatgat 8460
 gtcgtcgtgc acaacaatgg tgacttctac agcgcggaga atctcgctct ctccagggga 8520
 agccgaagtt tccaaaaggt cgttgatcaa agctcgccgc gtigtittcat caagccctac 8580
 ggtcaccgta accagcaaat caatacact gtgtggcttc aggccgccat ccactgcgga 8640
 gccgtacaaa tgtacggcca gcaacgtcgg ttcgagatgg cgctcgatga cgccaactac 8700
 ctctgatagt tgagtcgata cttcggcgat caccgcctcc ctcatgatgt ttaactcctg 8760
 aattaagccg cgccgcgaag cggigtcggc ttgaatgaat tgttaggcgt catcctgtgc 8820
 tcccgagaac cagtaccagt acatcgctgt ttcgttcgag acttgaggtc tagttttata 8880
 cgtgaacagg tcaatgccgc cgagagtaaa gccacatttt gcgtacaaat tgcaggcagg 8940
 tacattgttc gtttgtgtct ctaatcgtat gccaaaggagc tgtctgctta gtgcccactt 9000
 tttcgcaaat tcgatgagac tgtgcgcgac tccittgcct cggtcgctgt gcgacacaac 9060
 aatgtgttcg atagaggcta gatcgttcca tgttgagttg agticaatct tcccgacaag 9120
 ctcttggctg atgaatgcgc catagcaagc agagctttca tcagagtcct catccgagat 9180
 gtaatccttc cggtaggggc tcacacttct ggtagatagt tcaaagcctt ggtcggatag 9240
 gtgcacatcg aacacttcac gaacaatgaa atggttctca gcatccaatg ttccgccac 9300
 ctgctcaggg atcaccgaaa tcttcataatg acgcctaacg cctggcacag cggatcgcaa 9360
 acctggcgcg gcttttggca caaaaggcgt gacaggtttg cgaatccgtt gctgccactt 9420
 gttaaccctt ttgccagatt tggtaactat aatttatgtt agaggcgaag tcttgggtaa 9480
 aaactggcct aaaattgctg gggatttcag gaaagtaaac atcaccttcc ggctcgatgt 9540
 ctatigtaga tataatgtagt gtatctactt gatcggggga tctgctgctt cgcgcgtttc 9600
 ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg 9660

taagcggatg ccgggagcag acaagcccg1 cagggcgcg1 cagcgggtgt tggcgggtgt 9720
cggggcgag ccattgacca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg cttaactatg 9780
cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat 9840
gcgtaaaggag aaaataccgc atcaggcgct ctcccgcttc ctgcctcact gactcgctgc 9900
gctcggctgt tggctgcgg cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 9960
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 10020
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc 10080
atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc 10140
aggcgtttcc ccttggagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg 10200
gatacctgtc cgcccttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgtgtga 10260
ggtatctcag ttccggtgtg gtcgttcgt ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 10320
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagac 10380
acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 10440
gcgggtgctac agagtcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 10500
ttgggtatctg cgctctgtg aagccagtta ccttcggaaa aagagttagt agctcttgat 10560
ccggcaaaca aaccaccgt ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 10620
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 10680
ggaacgaaaa ctacagttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 10740
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtataat gagtaaacct 10800
ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagt aggcacctat ctacagcgtc tgtctatttc 10860
gttcatccat agttgcctga ctccccgtc tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 10920
catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctaccggct ccagatttat 10980
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggcctgca actttatccg 11040
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 11100
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctgcag gggggggggg ggggggggac ttccattgtt 11160
cattccacgg acaaaaacag agaaaggaaa cgacagaggc caaaaagcct cgctttcagc 11220
acctgtcgtt tctttcttt tcagagggtt ttttaaataa aaacattaag ttatgacgaa 11280
gaagaacgga aacgccttaa accggaaaat ttccataaat agcgaaaacc cgcgaggtcg 11340
ccgccccgta acctgtcgga tcaccggaaa ggaccgtaa agtgataatg attatcatct 11400

acataatcaca acgtgcgtgg aggccatcaa accacgtcaa ataatacaatt atgacgcagg 11460
 tatcgtatta atigatctgc atcaacttaa cgtaaaaaca acttcagaca atacaaatca 11520
 gcgacactga atacggggca acctcaigtc ccccccccc cccccctgc aggcatcgtg 11580
 gigtacgcct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga 11640
 gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt 11700
 gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct 11760
 ctactgtca tgcctccgt aagaigcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca 11820
 ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgccttggcc cggcgtcaac acgggataat 11880
 accgcgccac atagcagaac tttaaaagtgc ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga 11940
 aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tctaaccac tctgtcacc 12000
 aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 12060
 caaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 12120
 ctttttcaat attattgaag catttatcag gtttatgtc tcatgagcgg atacatat 12180
 gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gtccgcgcga catttccccg aaaagtgcc 12240
 cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg 12300
 aggccctttc gtcttcaaga attggtcgac gatcttgctg cgttcggata tttcgtgga 12360
 gtcccgcca cagaccgga ttgaaggcga gatccagcaa ctgcgccag atcatcctgt 12420
 gacggaactt tggcgcgtga tgaactggcca ggacgtcggc cgaaagagcg acaagcagat 12480
 cacgttttc gacagcgtcg gatttgcgat cgaggatttt tcggcgtgc gctacgtccg 12540
 cgaccgcgtt gagggatcaa gccacagcag cccactcgac ctctagccg acccagacga 12600
 gccaaaggat ctttttgga tgcgtctccg tcgtcaggct ttccgacgtt tgggtggttg 12660
 aacagaagtc attatcgtac ggaatgccaa gcactccga ggggaacct gtggttgga 12720
 tgcacataca aatggacgaa cggataaacc tttcacgcc cttttaataa tccgttattc 12780
 taataaacgc tcttttctct taggtttacc cgccaatata tctgtcaaa cactgatagt 12840
 ttaaaactgaa ggcgggaaac gacaatctga tcatgagcgg agaattaagg gagtcacgtt 12900
 atgacccccg ccgatgacgc gggacaagcc gttttacgtt tggaaactgac agaaccgcaa 12960
 cgttgaagga gccactcagc cc 12982

<211> 90

<212> DNA

<223> LB 配列を大文字で表す (1-25 及び 55-70)

<400> 2

```
ATTTACAATT GAATATATCC TGCCGccgct gccgctttgc acccgATTTA CAATTGAATA    60
TATCCTGCCG ccgctgccgc ttgcacccg                                           90
```

<210> 3

<211> 90

<212> DNA

<400> 3

```
cgggtgcaaa gcggcagcgg cggcaggata tattcaattg taaatcgggt gcaaagcggc    60
agcggcggca ggatatattc aattgtaaat                                           90
```

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<400> 4

```
catttctcgc ttaaccgtga caggc      25
```

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<400> 5

```
aaaccgcagc agggaggcaa acaat      25
```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05386

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 15/82, A01H 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG) , WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Plant Molecular Biology, 34, 1997 Allan Wenck et al., "Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during Agrobacterium-mediated transformation" pp.913-922	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1986 Horsch RB et al., "Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by Agrobacterium tumefaciens: role of T-DNA borders in the transfer process" pp.4428-4432	1-7
A	Plant Cell, 6, 1994 Martineau B. et al., "On defining T-DNA" pp.1032-1033	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, June 1986 George C. Jen et al., "The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation" pp.3895-3899	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
17 December, 1999 (17.12.99)

Date of mailing of the international search report
28 December, 1999 (28.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05386

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cell, 57, June 2, 1989 Guus Bakkeren et al., "Recovery of Agrobacterium tumefaciens T-DNA molecules from whole plants early after transfer", pp.847-857	1-7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No.199900483906 Hanson Bill et al., "A simple method to enrich an Agrobacterium-transformed population for plants containing only T-DNA sequences", Plant Journal, 19(6), September, 1999, pp.727-734	1-7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No.199598547959 Ramanathan V. et al., "Transfer of non-T-DNA portions of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T-L-DNA", Plant Molecular Biology, 28(6), 1995, pp.1149-1154	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/82, A01H 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)、WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant Molecular Biology, 34, 1997 Allan Wenck et al., "Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during Agrobacterium-mediated transformation" p. 913-922	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1986 Horsch RB et al., "Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by Agrobacterium tumefaciens: role of T-DNA borders in the transfer process" p. 4428-4432	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 12. 99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant Cell, 6, 1994 Martineau B. et al., "On defining T-DNA" p. 1032-1033	1 - 7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, June 1986 George C. Jen et al., "The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation" p. 3895-3899	1 - 7
A	Cell, 57, June 2, 1989 Guus Bakkeren et al., "Recovery of Agrobacterium tumefaciens T-DNA molecules from whole plants early after transfer" p. 847-857	1 - 7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199900483906 Hanson Bill et al., "A simple method to enrich an Agrobacterium-transformed population for plants containing only T-DNA sequences" Plant Journal, 19(6), Sep. 1999 p. 727-734	1 - 7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199598547959 Ramanathan V. et al., "Transfer of non-T-DNA portions of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T-L-DNA" Plant Molecular Biology, 28(6), 1995 p. 1149-1154	1 - 7